

学校编码: 10384

密级\_\_\_\_\_

学 号: 22420081151502

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

长江口-东海区域泉古菌丰度、多样性及  
*accA* 基因多样性研究

**Abundance, Diversity and *accA* gene  
Diversity of *Crenarchaeota* in the Yangtze  
River Estuary and East China Sea**

阳 藻

指导教师姓名: 焦念志 教授

专 业 名 称: 海 洋 生 物 学

论文提交日期: 2011 年 月

论文答辩时间: 2011 年 月

2011年 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于     年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月

# 目 录

摘要.....	I
ABSTRACT.....	III
第一章：绪论.....	1
1.1 海洋古菌的研究进展.....	1
1.1.1 古菌.....	1
1.1.2 海洋古菌.....	4
1.1.3 海洋浮游古菌的广泛分布.....	6
1.1.4 河口-边缘海区域浮游古菌的研究现状.....	8
1.2 泉古菌自养固碳.....	10
1.2.1 古菌的生理代谢机制.....	10
1.2.2 微型生物固碳机制.....	12
1.2.3 泉古菌的固碳机制.....	14
1.2.4 海洋微型生物碳泵.....	16
1.3 本论文的研究目的及意义.....	17
第二章 长江口-东海区域泉古菌丰度及多样性研究.....	19
2.1 研究背景.....	19
2.1.1 东海及长江口的环境概况.....	19
2.1.2 调查方法的选择.....	20
2.2 材料和方法.....	22
2.2.1 样品采集及处理.....	22
2.2.2 主要仪器.....	23
2.2.3 探针及引物.....	24
2.2.4 数据分析工具和软件.....	25
2.2.5 主要溶液及试剂.....	25

2.2.6 CARD-FISH操作流程	26
2.2.7 数据处理	29
2.2.8 环境样品DNA的提取、PCR扩增及DGGE分析	30
2.2.9 测序及系统发育分析	30
<b>2.3 结果</b>	<b>30</b>
2.3.1 基于CARD-FISH技术的泉古菌丰度调查	30
2.3.2 夏季长江口-东海表层环境因子	31
2.3.3 夏季长江口-东海表层浮游泉古菌与总细菌分布	32
2.3.4 夏季长江口-东海水柱环境因子	33
2.3.5 夏季长江口-东海水柱浮游泉古菌与总细菌分布	35
2.3.6 Spearman相关及线性回归分析	38
2.3.7 讨论 1	39
2.3.8 基于DGGE技术的泉古菌 16S rRNA多样性调查	39
2.3.9 讨论 2	44
<b>2.4 本章小结</b>	<b>44</b>
<b>第三章 长江口-东海区域泉古菌自养固碳功能基因<math>accA</math>的分布及遗传多样性研究</b>	<b>46</b>
3.1 研究背景	46
3.2 材料和方法	47
3.2.1 样品采集及处理	47
3.2.2 环境样品DNA 的提取及PCR扩增	48
3.2.3 泉古菌 $accA$ 基因文库构建以及测序分析	50
3.2.4 统计分析	50
<b>3.3 结果</b>	<b>50</b>
3.3.1 采样站位的环境参数	50
3.3.2 泉古菌 $accA$ 基因克隆文库分析	52
<b>3.4 讨论</b>	<b>61</b>
<b>第四章 结论与展望</b>	<b>62</b>

4.1 主要结论 .....	62
4.2 本研究不足之处 .....	63
4.3 展望 .....	63
参考文献 .....	65
发表文章 .....	79
致 谢 .....	80

## Contents

<b>CHINESE ABSTRACT .....</b>	<b>I</b>
<b>ENGLISH ABSTRACT .....</b>	<b>III</b>
<b>CHAPT 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 MAJOR ADVANCES IN MARINE <i>ARCHAEA</i> .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Brief introduction about <i>Archaea</i> .....	1
1.1.2 Marine <i>Archaea</i> .....	4
1.1.3 Widespread of Planktonic <i>Archaea</i> .....	6
1.1.4 Current research status of planktonic <i>Archaea</i> in coastal regions .....	8
<b>1.2 AUTOTROPHIC CARBON FIXATION IN PLANKTONIC <i>CRENARCHAEOTA</i> .....</b>	<b>10</b>
1.2.1 Metabolic mechanism of Planktonic <i>Archaea</i> .....	10
1.2.2 Autotrophic carbon fixation mechanisms in Microbes .....	12
1.2.3 Autotrophic carbon fixation mechanisms in planktonic <i>Crenarchaeota</i> ....	14
1.2.4 Microbial Carbon Pump .....	16
<b>1.3 DESIGN OF THIS THESIS AND RESEARCH SIGNIFICANCE .....</b>	<b>17</b>
<b>CHAPT 2 ABUNDANCE AND COMMUNITY DIVERSITY OF PLANKTONIC <i>CRENARCHAEOTA</i> IN THE YANGTZE RIVER ESTUARY .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 BACKGROUND .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Environmental features of the Yangtze River estuary .....	20
2.1.2 Correlative molecular techniques for this study .....	22
<b>2.2 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Sampling and determination of environmental variables .....	23
2.2.2 Devices involved in this research .....	24
2.2.3 Probes and primers used in this study .....	25

2.2.4 Softwares for data acquiring and analysis .....	25
2.2.5 Experimental materials involved in this research .....	25
2.2.6 CARD-FISH protocol .....	26
2.2.7 Formula and caculation .....	29
2.2.8 DNA extraction,PCR amplification and DGGE analysis .....	30
2.2.9 Sequencing and Phylogenetic analysis of archaeal 16S rRNA genes .....	30
<b>2.3 RESULTS .....</b>	<b>30</b>
2.3.1 Abudance of Planktonic <i>Crenarchaeota</i> .....	30
2.3.2 Environmental variables in the surface layer among the sampling sites ....	31
2.3.3 Distribution of Planktonic <i>Crenarchaeota</i> , Bacteria and DAPI in the surface layer among the sampling sites .....	32
2.3.4 Environmental variables in the water column among the sampling sites ...	33
2.3.5 Distribution of Planktonic <i>Crenarchaeota</i> , Bacteria and DAPI in the water column among the sampling sites .....	35
2.3.6 Spearman rank correlation analysis and linear regression analysis .....	38
2.3.7 Discussion 1 .....	39
2.3.8 Community diversity analysis of <i>Crenarchaeota</i> .....	39
2.3.9 Discussion 2 .....	44
<b>2.4 BRIEF SUMMARY .....</b>	<b>44</b>
<b>CHAPT 3 DISTRIBUTION AND GENETIC DIVERSITY OF PLANKTONIC <i>CRENARCHAEOTA</i> IN THE YANGTZE RIVER ESTUARY: ANALYSIS BASED ON CLONE LIBRARIES OF <i>accA</i> GENES .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1 BACKGROUND .....</b>	<b>46</b>
<b>3.2 MATERIALS AND METHODS .....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Sampling and determination of environmental variables .....	47
3.2.2 DNA extraction and PCR amplification .....	48
3.2.3 Clone library construction and analysis .....	50



3.2.4 Statistic analysis.....	50
<b>3.3 RESULTS .....</b>	<b>50</b>
3.3.1 Environmental variables in the sampling sites.....	50
3.3.2 Phylogenetic analysis of <i>accA</i> clone libraries.....	52
<b>3.4 DISCUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>CHAPT 4 CONCLUSIONS AND ORIGINALITY OF THIS THESIS</b>	
<b>.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1 MAJOR CONCLUSIONS .....</b>	<b>62</b>
<b>4.2 PROBLEMS AND DEFICIENCY .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3 PERSPECTIVES .....</b>	<b>63</b>
<b>REFERENCES.....</b>	<b>65</b>
<b>MANUSCRIPTS DURING GRADUATE STUDY.....</b>	<b>79</b>
<b>ACKNOWLEDGEMENTS .....</b>	<b>80</b>

## 摘要

以往认为古菌仅分布于极端环境（如深海、热液口等）。但近二十年来的研究表明，古菌广泛存在于海洋生态系统中，如开阔大洋、沉积物等各种海洋环境。泉古菌Marine Group I (MGI) 是目前已知分布最广、数量最丰富（最高可达原核生物总量的39%）的海洋古菌类群，是海洋微生物的重要组成之一，在海洋生物地球化学循环中扮演着举足轻重的角色。虽然针对深海大洋浮游泉古菌研究已有一些报道，但对海洋生态系统中关键的河口-边缘海环境中的泉古菌的生态特性和生态效应的认识还极为缺乏。本论文利用分子生态学手段对我国长江口-东海区域浮游泉古菌的分布、多样性及生态功能开展了以下研究：

1. 运用酶联免疫荧光原位杂交法(Catalyzed Reporter Deposition Fluorescent *in situ* Hybridization, CARD-FISH) 结合荧光显微镜观测对长江口-东海区域三个断面的调查结果表明，长江口-东海区域表层水体中的泉古菌丰度及其相对比例（相对于微生物总量）较低，但其丰度与相对比例随着深度的增加而显著递增；统计分析表明，泉古菌丰度及其相对比例与温度呈显著负相关，而与盐度呈显著正相关。

2. 基于泉古菌16S rRNA基因的变性梯度凝胶电泳（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis, DGGE）及测序的分析表明，长江口区域泉古菌的多样性比外海区域更高，这可能是长江冲淡水带来的陆源输入造成；泉古菌16S rRNA基因的系统发育分析表明，长江口-东海区域浮游泉古菌均属于MGI类群。

3. 泉古菌自养固碳基因 $accA$ 克隆文库分析表明，长江口-东海区域冬夏季均广泛分布着自养泉古菌；基于 $accA$ 基因的系统发育分析表明，来自不同季节的 $accA$ 功能基因分属于不同的系统发育分支，表明泉古菌不同类群对季节或相关的环境因素有相应的适应机制；自养泉古菌群落统计分析表明，长江口区域的泉古菌群落组成与其他海区的泉古菌显著不同，说明河口泉古菌群落受到了长江冲淡水的影响。

本论文描述了长江口-东海区域泉古菌的丰度和多样性分布；并分析了该海区泉古菌自养固碳功能基因 $accA$ 的遗传多样性，比较了自养泉古菌群落组成的季

节差异，揭示了浮游泉古菌在长江口-东海生态系统中的重要地位。

**关键词：**长江口-东海；泉古菌；丰度；多样性；16S rRNA；*accA*；

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## ABSTRACT

Originally, Archaea were believed to be restricted to extreme environments. However, this view has been changed dramatically in last two decades, since comprehensive studies have shown that archaea were widely distributed in the marine environments from surface waters to deep ocean. The marine *Crenarchaeota* group I (MGI) have been known to be the most ubiquitous and abundant *Archaea* in the global ocean biosphere and constitute a significant component of prokaryotic community, suggesting that they play an important role in the marine biogeochemical cycles. Although the ecological importance of *Crenarchaeota* is shown in deep ocean environment, few studies have focused on the planktonic *crenarchaeota* in the estuarial environments (e.g. the Yangtze River estuary). Therefore we used molecular ecological techniques to investigate the abundance, genetic diversity, and ecological function of marine planktonic *crenarchaeota* in this environment.

Firstly, we use Catalyzed Reporter Deposition Fluorescent *in situ* Hybridization to efficiently detect MGI in environmental samples in the three transects of the Yangtze River estuary. The results showed that *Crenarchaeota* distributed widely in the Yangtze River estuary. The abundance and relative abundance of MGI were low in the surface water and increased significantly with depth. Statistic analysis showed that the abundance and relative abundance of MGI were negatively correlated with temperature and positively correlated with salinity.

In addition, the community structures of *Crenarchaeota* were evaluated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis analysis of PCR amplified 16S rRNA gene fragments. The results demonstrated that the archaeal diversity is higher in estuarine regions than offshore area, indicating the influence of Changjiang Diluted Water. Phylogenetic analyses indicated that all archaeal 16S rRNA gene sequences obtained from East China Sea belonged to the MGI lineage.

Finally, we focus on the ecological function and the community structure of planktonic *Crenarchaeota* of different seasons. Clone libraries of crenarchaeal *accA* gene analysis indicated that *accA* gene were widespread in the Yangtze River estuary both in summer and winter. In the amino acid-based phylogenetic tree, sequences recovered from summer and winter fell into different clusters. This suggested that different marine *Crenarchaeota* may adapt for temporal variations of local environments in the Yangtze River estuary. The effects of Changjiang River discharge to the marine planktonic archaeal community were indicated by statistical analysis based on comparing the difference of community composition.

In summary, the present study investigated crenarchaeal abundance and diversity, as well as the temporal variations of autotrophic *Crenarchaeota* community composition in the Yangtze River estuary and East China Sea. Planktonic *Crenarchaeota* are an important marine microbial group, and might have significant effects on biogeochemical cycles in the ecosystem of the Yangtze River estuary and East China Sea.

**Key words:** the Yangtze River estuary and East China Sea; *Crenarchaeota*; abundance; diversity; 16S rRNA; *accA*

## 第1章 绪论

### 1.1 海洋古菌的研究进展

#### 1.1.1 古菌

20 世纪 70 年代末, Woese 等学者基于核糖体小亚基 (16S rRNA) 核酸序列的系统发育关系, 提出了原核生物由“真细菌”(Eubacteria) 和“古细菌”(Archaeobacteria) 两个类群构成的观点 (Woese and Fox, 1977; Woese et al., 1978), 引起广泛争议。随着研究的深入, “古细菌”在生化、遗传、生理等方面的独特性不断被发掘。“古细菌”与“真细菌”虽在形态、主要生物学结构等方面有相似性, 在基因转录翻译等重要方面却与真核生物有共同点。鉴于“古细菌”与“真细菌”、真核生物之间的显著差异, 1990 年, Woese 将“古细菌”的命名调整为古菌 (Archaea), 并将所有生物重新划分为生命三域 (Woese et al., 1990), 包括真核生物 (Eukaryota)、细菌 (Bacteria) 和古菌 (Archaea) 三个独立域 (Domain)。见图 1-1。

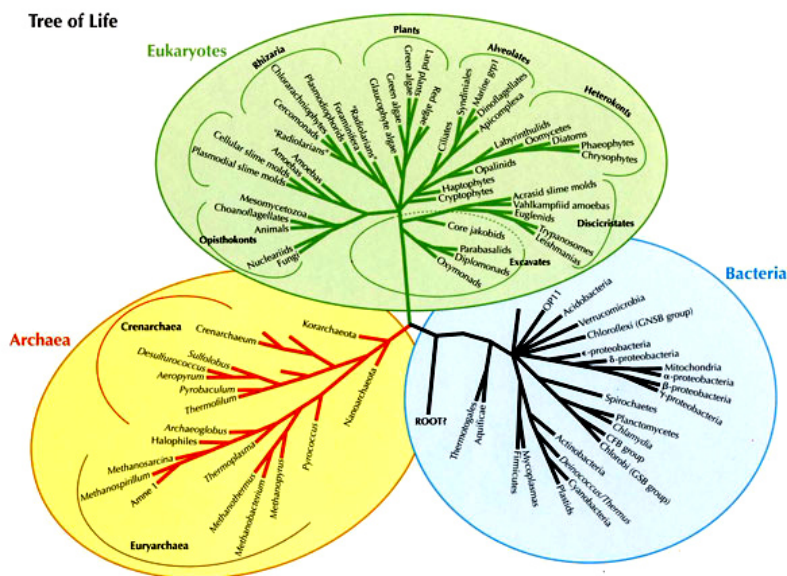


图 1-1 生命三域图 (Nicholas Barton et al., 2007)

Fig. 1-1 Three domain of life (Nicholas Barton et al., 2007)

生命三域理论的提出,得到世界绝大多数学者的认可。同时,随着分子生物学技术的迅速发展并广泛应用于环境微生物学研究,人们对古菌分布及生态地位的认识不断加深。目前古菌可分为广古菌 (*Euryarchaeota*) 和泉古菌 (*Crenarchaeota*) 两大类。曾有学者提出存在两类新的古菌:仅在海底热液口发现的初生古菌 (*Korarchaeota*) (Barns et al., 1996) 以及营共生生活的纳米古菌 (*Nanoarchaeota*) (Huber et al., 2002; Huber et al., 2003),但随着 16S rRNA 基因数据的不断积累,初生古菌和纳米古菌分别被重新归类为泉古菌和广古菌 (Robertson et al., 2005)。由于对古菌的认识有限,以上的分类标准仍有可能更新。

单个古菌细胞直径在 0.1 到 15  $\mu\text{m}$  之间,由细胞壁、细胞膜、细胞质和胞内的遗传物质等细胞结构组成,没有内膜系统,DNA 以单个环状结构存在于细胞内。一些种类可以通过蛋白质网形成大的细胞团簇,长度可达 200  $\mu\text{m}$ ,如热球菌属的嗜热古菌 *Thermococcus* (Kuwabara et al., 2005)。古菌细胞的形状多样,包括球形、杆形、螺旋形、叶状或方形等。

古菌的细胞壁与细菌功能类似但化学成分差别较大 (Thomas et al., 2001),古菌的细胞壁物质极为多样,其中没有肽聚糖、纤维素和几丁质,而是由多糖、糖蛋白或蛋白质构成的,如甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina*) 古菌的细胞壁均由多糖组成;盐杆菌属 (*Halobacterium*) 古菌的细胞壁由糖蛋白组成,其带强负电荷的酸性氨基酸构成的特殊蛋白可以平衡环境中高浓度的钠离子,从而使其能很好的适应 20~25%高盐浓度的环境;甲烷微菌 (*Methanomicrobium*)、甲烷球菌 (*Methanococcus*) 和甲烷螺菌 (*Methanospirillum*) 等一些产甲烷古菌的细胞壁则由同种或多种不同蛋白质组成 (Kandler and König, 1998)。

古菌的细胞膜在主要成分和连接方式上与细菌、真核生物均有不同。如,古菌的膜磷脂成分是 D 型磷酸甘油,而不是细菌和真核生物的 L 型磷酸甘油;疏水尾的长链烃主要由异戊二烯的重复单位组成,然后与甘油的亲水头通过醚键而不是酯键连接成甘油二醚或二甘油四醚、脂肪酸等 (Valentine, 2007);其次,古菌细胞质膜中有着独特的单分子层膜或单、双分子层混合膜或 S 层 (S layer) 结

构，而细菌或真核生物的细胞质膜都是双分子层。如，嗜高温的古菌中多见单分子层，其磷脂为二甘油四醚，连接两个甘油分子间的两个植烷侧链之间通常会共价结合形成二植烷，导致了细胞膜的机械强度要比双分子层质膜更高（Albers et al., 2000）；另外对古菌的糖脂成分，如甘油二醚、甘油四醚类物质，特别是四醚类物质中的甘油二烷基甘油四醚脂 GDGTs（Glycerol dialkyl glycerol tetraethers，图 1-2）的研究较深入，利用这一组分可以获得泉古菌数量、群落结构（Koga and Morii, 2007）等信息，在对极端环境古菌的报道中十分多见。

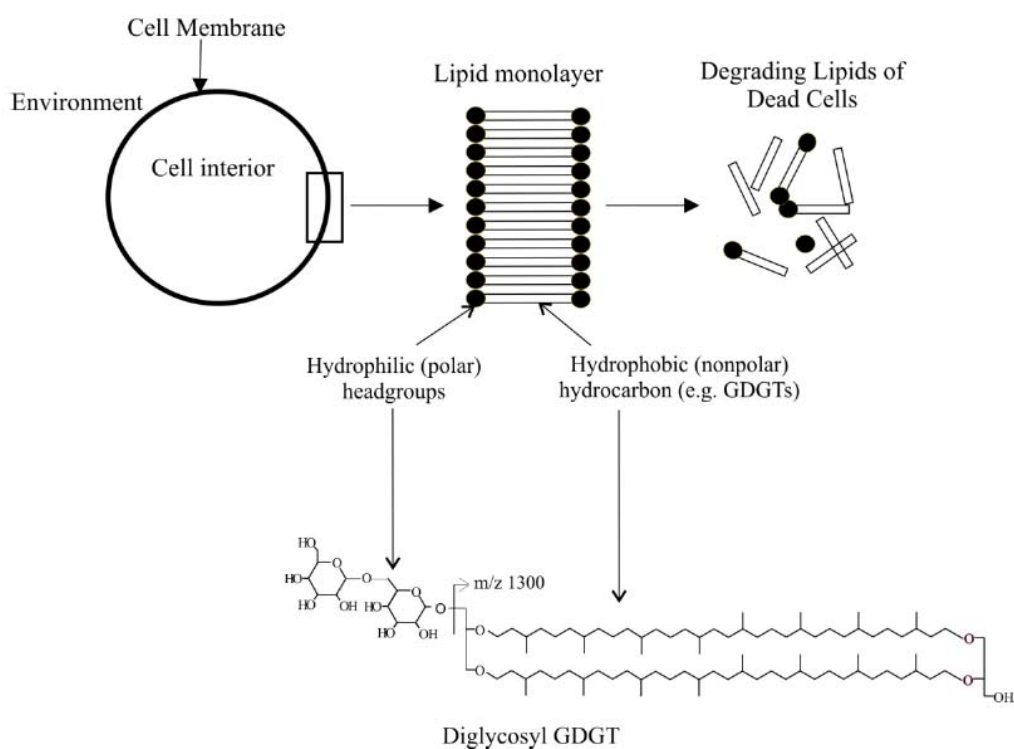


图 1-2 泉古菌的细胞膜及脂单层结构示意图：由甘油二烷基甘油四醚脂 GDGTs 与极性的亲水性头部构成。（Schouten et al., 2008）

Fig. 1-2 Schematic of a cell membrane and lipid monolayer (typical of *Crenarchaeota*) comprised of GDGTs with polar headgroups. (Schouten et al., 2008)

古菌的染色体结构与细菌相似，主要由不含核膜的单个环状 DNA 分子构成，



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库